

# リケッチア症レファレンスセンター会議2018

全国衛生微生物技術協議会, 2018年7月5日, 大津(滋賀)

- 北海道東北  
福島県衛生研究所  
青森県環境保健センター
- 関東甲信静  
東京都健康安全研究センター  
千葉県衛生研究所
- 東海北陸  
三重県保健環境研究所  
富山県衛生研究所
- 近畿  
和歌山県環境衛生研究センター  
兵庫県立生活科学研究所健康科学研究センター
- 中国・四国  
岡山県環境保健センター  
広島県総合科学研究所環境保健センター  
高知県衛生研究所
- 九州  
宮崎県衛生環境研究所  
鹿児島県環境保健センター

世話人 安藤秀二  
国立感染症研究所  
ウイルス第一部第五室  
shuando@nih.go.jp

# 本日の予定

- **イントロ（現状確認、発生状況 等）**
- **診断マニュアルについて（方針）**
- **情報発信について1**
- **情報発信について2**
- **意見交換**

## 感染症法

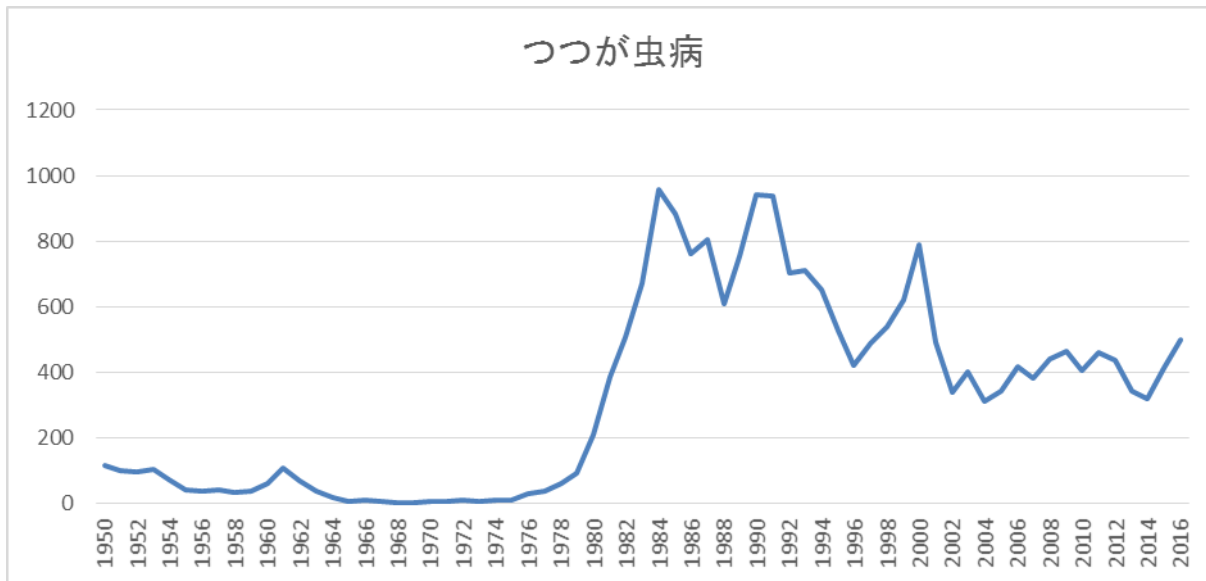
- ・日本紅斑熱 (*R. japonica*, 3種)
- ・つつが虫病 (*O. tsutsugamushi*)
- ・ロッキー山紅斑熱 (*R. rickettsii*, 3種)
- ・発疹チフス (*R. prowazekii*, 3種)

## その他

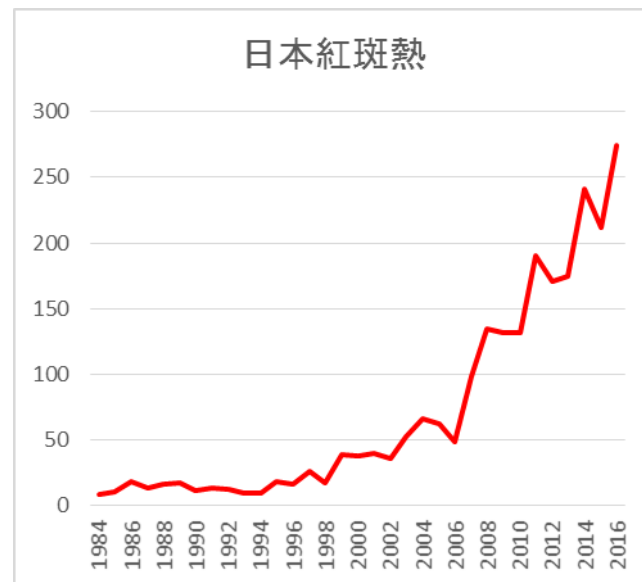
- ・発疹熱 (*R. typhi*)
- ・極東紅斑熱 (*R. heilongjiangensis*)
- ・地中海紅斑熱 (*R. conorii*)
- ・*R. helvetica*
- ・African tick bite fever (*R. africae*)
- ・Flinder tick bite fever (*R. honei*)
- ・*R. sibirica*                   ほか多種

## 過去10年で日本が経験したリケッチア症

- ・つつが虫病
- ・日本紅斑熱
- ・極東紅斑熱
- ・地中海紅斑熱
- ・African tick bite fever
- ・Queensland tick fever (*R. australis*)
- ・*R. tamurae*
- ・*R. helvetica*
- ・*Ca R. indica*
- ・発疹熱



2017年暫定  
 つつが虫病: 439例  
 日本紅斑熱: 337例



25w	JSF	Scabtyphus	SFTS
2018	75/?	86/?	35/?
2017	89/337	91/439	37/90
2016	63/275	79/500	25/60
2015	56/212	65/415	24/60
2014	48/240	78/317	23/61

# 本日の予定

- **イントロ（現状確認、発生状況等）**
- **診断マニュアルについて（方針）**
- 情報発信について1
- 情報発信について2
- **意見交換**

## ツツガムシ病診断マニュアル

はじめに	1
血清診断法	
I. 間接蛍光抗体法 Indirect immunofluorescence assay (IF法)	2
1. 培養および抗原スライドの作成法	
2. 検査法	
3. 判定	
II. 間接免疫ペルオキシダーゼ法 Indirect immunoperoxidase assay (IP法)	6
1. 抗原スライドの作成法	
2. 検査法	
3. 試薬調整	
4. 留意点	
5. 参考文献	
病原体検出法	
III. PCRによる遺伝子検出法	9
1. 検査材料	
2. DNAの抽出法	
3. NestedPCR法による遺伝子検出	
4. NestedPCR法による遺伝子型別	
5. 参考文献	
IV. 病原体の分離法	17
1. はじめに	
2. 野ネズミの捕獲法	
3. 捕獲後の処置, (麻酔, 全採血, 計測, 解剖, 材料摘出)	
4. マウスへの接種法	
5. マウスの観察および飼育管理 (給餌, 給水, 床敷交換など)	
6. マウスの病変観察, <i>O. tsutsugamushi</i> 感染の確認および継代	
7. 注意	

## 紅斑熱群リケッチア症診断マニュアル

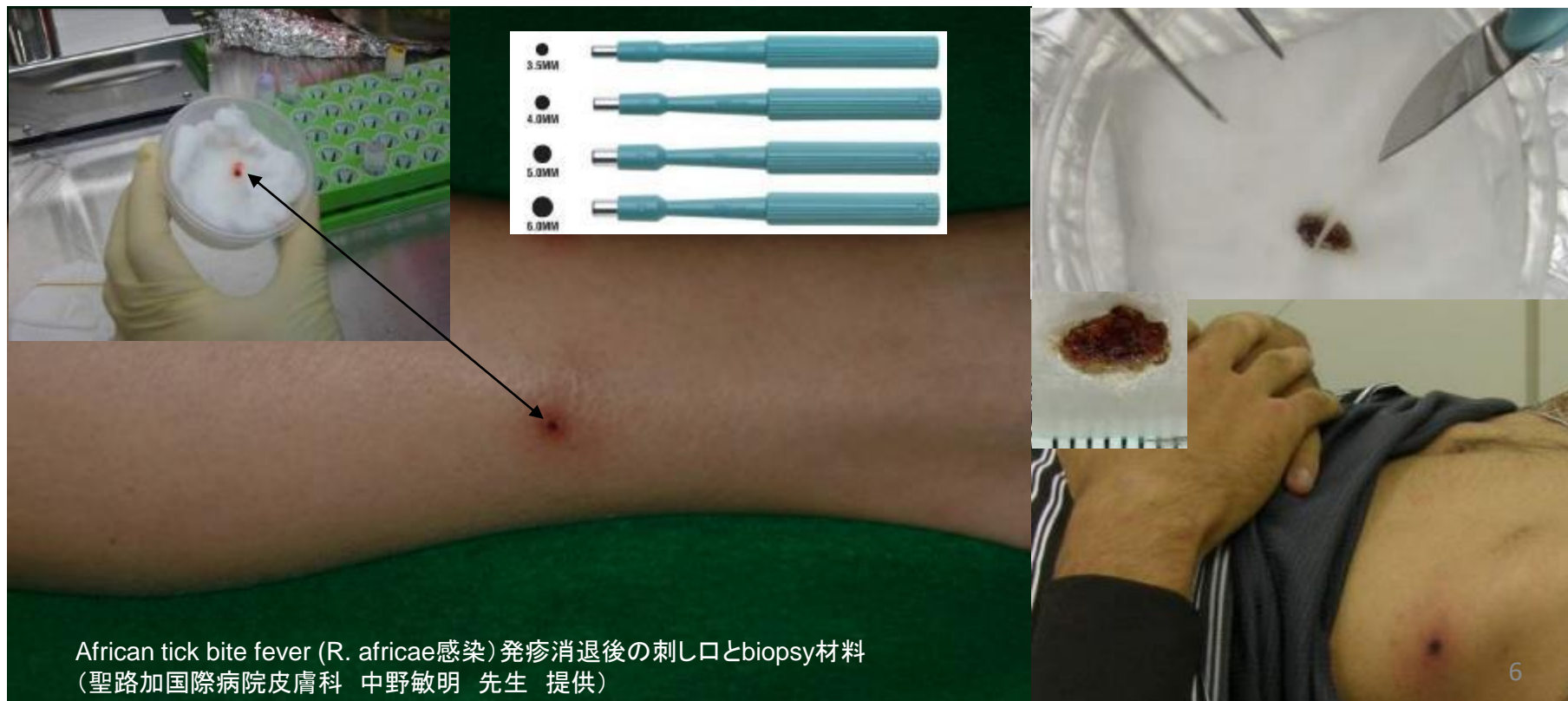
はじめに	1
血清診断法	
I. 間接蛍光抗体法 Indirect immunofluorescence assay (IF法)	2
1. 紅斑熱群リケッチアの継代に使用する細胞	
2. <i>Rickettsia japonica</i> の継代	
3. 抗原スライドの作成	
4. 検査法	
5. 診断基準 写真 (IF法)	
病原体検出法	
II. 遺伝子増幅法 (PCR法)	7
1. DNA抽出法	
2. DNA抽出材料	
3. プライマー	
4. PCR法	
III. リケッチアの分離法	8
1. 分離材料	
2. 分離方法	
今後の課題	11
参考文献	11

# リケッチア症の遺伝子検査検体

紅斑熱群リケッチア(日本紅斑熱): 痂皮(Eschar) > 紅斑部生検 ≧ 急性期血液\*  
つつが虫病: 痂皮(Eschar) > 紅斑部生検 ≧ 急性期血液\*  
発疹チフス群リケッチア: 紅斑部生検 ≧ 急性期血液  
\* 血液は抗菌薬投与前

検査への提出は,

- 痂皮等は乾燥しない程度に生食等で湿らせたガーゼ等に包んで検査室に。
- セーラムチューブやスピッツ等では綿球を使うと便利。




# リケッチア症に用いる遺伝子検出

- Hanaoka et al (*R. japonica* Realtime PCR, *R. heilongjiangensis*, *Emerg Infect Dis* 15:1994-7, 2009)
- Conventional PCR (*Rickettsia* spp 17kDa, *gltA*, H20希少感染症研修会, *R. japonica* 17kDa Furuya et al,)
- Conventional PCR (*O. tsutsugamushi* TSA, Furuya et al: *J Clin Microbiol* (1991) 29:2628-, (1993) 31: 1637-

& Satoh H et al: *Med. Entomol. Zool* (2014) 65:183-

- |  |  |
|--|--|
| 1. 国内の紅斑熱群リケッチア症の多様性<br>( <i>R. japonica</i> , <i>R. heilongjiangensis</i> , <i>R. tamurae</i> ,<br><i>R. helvetica</i> etc) | 5. 輸入感染症( <i>O. tsutsugamushi</i> , <i>R. africae</i> ,<br><i>R. conorii</i> , <i>R. australis</i> , <i>Cand. R. indica</i> etc) |
| 2. 日本紅斑熱発生地拡大  | 6. ダニ媒介感染症の多様化   |
| 3. 日本紅斑熱とつづが虫病の発生時期の<br>重なり(=臨床的には鑑別困難)  | 7. その他(血清診断の不適用、迅速性、単<br>純化・・・)  |
| 4. つづが虫病 <i>Orientia</i> の多様性(最低6型)  |  |

- Kawamori et al (SFG and Scrub typhus Realtime PCR, H26衛微協)

 <Primer 1組 + Probe 2種 (for 紅斑熱群リケッチア, for つづが虫病リケッチア)>

# PCR flow

1. Realtime PCR (universal and/or specific), and/or LAMP
2. Conventional PCR (specific and/or universal)

The 1<sup>st</sup> target for *Rickettsia* spp: 17k Da antigen, citrate synthase ( *gltA* )

for Scrub typhus: TSA (56 k Da) and/or 47 k Da

3. Sequencing



Format: Abstract Send to

Jpn J Infect Dis, 2018 Apr 27. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.447. [Epub ahead of print]

### Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan.

Kawamori F<sup>1,2</sup>, Shimazu Y<sup>3</sup>, Sato H<sup>4</sup>, Monma N<sup>5</sup>, Ikegaya A<sup>1</sup>, Yamamoto S<sup>6</sup>, Fujita H<sup>7</sup>, Morita H<sup>8</sup>, Tamaki Y<sup>9</sup>, Takamoto N<sup>2</sup>, Su H<sup>2</sup>, Shimada M<sup>2</sup>, Shimamura Y<sup>2</sup>, Masuda S<sup>2</sup>, Ando S<sup>10</sup>, Ohashi N<sup>2</sup>.

Author information

**Abstract**  
 Tsutsugamushi disease (TD) and Japanese spotted fever (JSF) are known as representative rickettsioses in Japan, and caused by infection with *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia japonica*, respectively. For molecular-based diagnosis, conventional PCRs which independently amplify respective rickettsial DNAs are usually used, but it's time-consuming. Here, we describe a new duplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *O. tsutsugamushi* and spotted fever group rickettsiae, and evaluated under several PCR conditions in 6 public health laboratories. The detection limit of the assay was estimated 10<sup>2</sup> copies and the sensitivity was almost same as that of 3 conventional PCRs. Total of 317 febrile patients were selected as clinically suspected or confirmed cases for rickettsioses. The detection efficiency of this assay for *O. tsutsugamushi* from specimens of blood or skin (eschar) seems to be almost same as that of conventional nested PCR even in different laboratory tests, while the efficiency for SFG rickettsiae tends to be higher than that of 2 traditional double PCRs. Our duplex real-time PCR is a powerful tool for rapid diagnosis of rickettsioses, especially at the acute stage of infection.

**KEYWORDS:** *Orientia tsutsugamushi*; *Rickettsia japonica*; diagnosis; duplex real-time PCR; rickettsiosis

PMID: 29709963 DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.447

Free full text



LinkOut - more resources +

You are here: NCBI > Literature > PubMed

GETTING STARTED	RESOURCES	POPULAR	FEATURED
NCBI Education	Chemicals & Bioassays	PubMed	Genetic Testing Registry
NCBI Help Manual	Data & Software	Bookshelf	PubMed Health
NCBI Handbook	DNA & RNA	PubMed Central	GenBank
Training & Tutorials	Domains & Structures	PubMed Health	Reference Sequences
Submit Data	Genes & Expression	BLAST	Gene Expression Omnibus
	Genetics & Medicine	Nucleotide	Genome Data Viewer
	Genomes & Maps	Genome	Human Genome
	Homology	SNP	Mouse Genome
	Literature	Gene	Influenza Virus
	Proteins	Protein	Primer-BLAST
	Sequence Analysis	PubChem	Sequence Read Archive
	Taxonomy		
	Variation		

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine  
 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA  
 Policies and Guidelines | Contact

# Advance Publication by J-STAGE

## Japanese Journal of Infectious Diseases

### Evaluation of Diagnostic Assay for Rickettsioses Using Duplex Real-Time PCR in Multiple Laboratories in Japan

Fumihiko Kawamori, Yukie Shimazu, Hiroko Sato, Naota Monma, Asaka Ikegaya, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Hiroshi Morita, Yukiko Tamaki, Naoya Takamoto, Hongru Su, Masahiko Shimada, Yuko Shimamura, Shuichi Masuda, Shuji Ando, and Norio Ohashi

Received: October 7, 2017. Accepted: March 6, 2018.

Published online: April 27, 2018.

DOI: 10.7883/yoken.JJID.2017.447

Advance Publication articles have been accepted by JJID but have not been copyedited or formatted for publication.

## Specificity of Ot-Rj-duplex real-time PCR in Rickettsiales bacteria

Species	Strain (serotype)	Source	Ot-Rj-duplex real-time PCR		Hanaoka Rj-FAM <sup>1)</sup>
			Ot-FAM	Rj-VIC	
<b>(Orientia)</b>					
<i>O. tsutsugamushi</i>	Gilliam	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Karp	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Kato	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Irie/Kawasaki	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Hirano/Kuroki	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	Shimokoshi	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	JP-2: Sato Gilliam)	Human	Ot-FAM positive	Negative	Negative
	JG: Kasei (Karp)	Apodemus speciosus	Ot-FAM positive	Negative	Negative
<b>(Rickettsia)</b>					
<i>R. japonica</i>	YH	Human	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
	FT	Human	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
<i>R. heilongjiangensis</i>	CH8-1	Haemaphysalis concinna	Negative	Rj-VIC positive	Rj-FAM positive
<i>R. asiatica</i>	IO-1	Ixodes ovatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	IO-46	Ixodes ovatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. conorii</i>	Malindi	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. helvetica</i>	PP-1	Ixodes persulcatus	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	IC-1	Ixodes columnae	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. honei</i>	TT-118	Ixodes sp.	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. rickettsii</i>	Sheila Smith	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. sibirica</i>	246	Human	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. tamurae</i>	AT-1	Amblyomma testudinarium	Negative	Rj-VIC positive	Negative
	HM-1	Haemaphysalis megaspinoso	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. australis</i>			Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>Rickettsia</i> sp. LON	LON-2	Haemaphysalis longicornis	Negative	Rj-VIC positive	Negative
<i>R. monacensis</i> (formaly In-56)	IN-1	Ixodes nipponensis	Negative	Ri-VIC positive	Negative
<i>R. prowazekii</i>	brein1	Human	Negative	Negative	Negative
<i>R. typhi</i>	Wilmington	Human	Negative	Negative	Negative
<i>R. canadensis</i>	FLA-2	Haemaphysalis flava	Negative	Negative	Negative
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	HZ	Human	Negative	Negative	Negative
<i>Ehrlichia chaffensis</i>	Arkansas	Human	Negative	Negative	Negative
<i>E. muris</i>	AS145 <sup>T</sup>	Eothenomys kageus	Negative	Negative	Negative
<i>Ehrlichia</i> sp. HF ( <i>E. ovatus</i> )	HF565	Ixodes ovatus	Negative	Negative	Negative

R. africae未検出可能

Detection assays of *O. tsutsugamushi* (Ot) and *R. japonica* (Rj) DNAs from febrile patients by Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and serological tests in 6-endemic prefectures of Japan, 1997-2016

Location (year)	Total nos. of febrile patients tested	Laboratory tested <sup>1)</sup>	Ot				Rj					Ot-Rj-duplex real-time PCR
			Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs <sup>2)</sup>	Serological test of IFA <sup>3)</sup> or IPA <sup>4)</sup>	Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) <sup>5)</sup>	Ot-Rj-duplex real-time PCR	Conventional PCRs <sup>2)</sup>	Serological test of IFA <sup>3)</sup> or IPA <sup>4)</sup>	Nos. of patients diagnosed/total patients tested (%) <sup>5)</sup>		
			Nos. of positive/patients tested (%)	Nos. of nested PCR positive/patients tested (%)	Nos. of seropositive/patients tested (%)		Nos. of positive/patients tested (%)	Nos. of double PCR positive/patients tested (%)	Nos. of SFGR-double PCR positive/patients tested (%)	Nos. of seropositive/patients tested (%)	Range of Cq value	
Akita (1997-2015)	33	秋田県	33/33 (100)	33/33 (100) <sup>6)</sup>	18/33 (55%) <sup>4)</sup>	33/33 (100)	0/33	NT <sup>10)</sup>	NT	NT	0/33	24.4-37.7
Fukushima (2010-2013)	67	福島県	64/67 (96)	67/67 (100) <sup>6)</sup>	67/67 (100) <sup>4)</sup>	67/67 (100)	0/67	NT	NT	NT	0/67	21.6-41.0
Shizuoka (2010-2016)	28	静岡県	18/28 (64)	18/28 (64)	21/28 (75) <sup>3)</sup>	21/28 (75)	3/28 (11) <sup>8)</sup>	NT	NT	3/28 (11)	4/28 (14)	27.9-40.0
Wakayama (2008-2012)	22	静岡県	3/22 (14)	3/22 (14)	3/22 (14) <sup>3)</sup>	3/22 (14)	9/22 (41)	5/22 (23)	5/22 (23)	12/22 (55) <sup>4)</sup>	12/22 (55)	21.3-40.1
Miyazaki (2008-2009)	28	静岡県	11/28 (39)	11/28 (39)	11/28 (39) <sup>3)</sup>	11/28 (39)	7/28 (25)	2/28 (7)	2/28 (7)	9/28 (32) <sup>3)</sup>	9/28 (32)	22.6-41.0
Subtotal <sup>7)</sup>			129/178 (72)	132/178 (74)	120/178 (67)	135/178 (76)	16/50 (32)	7/50 (14)	7/50 (14)	21/50 (42)	21/50 (42)	
Hiroshima (2013-2015)	139	HPTRI	6/139 (4) <sup>8)</sup>	6/33 (18)	2/13 (15) <sup>3)</sup>	6/139 (4)	55/139 (40) <sup>8)</sup>	12/31 (39)	54/102 (53)	4/13 (31) <sup>3)</sup>	56/139 (40)	22.0-37.9
<b>Total</b>	<b>317</b>		<b>135/317 (43)</b>			<b>141/317 (44)</b>	<b>74/317 (23)</b>				<b>81/317 (26)</b>	

<sup>2)</sup>: Conventional PCRs were performed by the procedures of previous studies: Ot-nested PCR (9, 13), Rj-double PCR (10), and SFGR-double PCR (6).

<sup>3)</sup>: Assayed by indirect immunofluorescent assays (IFA: potentially positive of more than 40 antibody titer).

<sup>4)</sup>: Assayed by indirect immunoperoxidase assays (IPA: potentially positive of more than 80 antibody titer).

<sup>5)</sup>: Final results of rickettsiosis determined by a combination of Ot-Rj-duplex real-time PCR, conventional PCRs, and/or serological tests (IFA or IPA).

<sup>6)</sup>: Ot-nested PCR was done by some modifications to improve the low detection efficiency of *O. tsutsugamushi* Shimokoshi strain as described previously first-step PCR and the PCR was run with the 3 primers.

An alternative degenerate primer (10m2: 5'-CCDCCTCARCCTAMTATRATGCC-3') instead of 11' primer in Table 1 was used for second-step PCR.

<sup>7)</sup>: The subtotal consisting of confirmed cases of rickettsioses was obtained for statistics analysis as shown in Table 5.

<sup>8)</sup>: Ot-Rj-duplex real-time PCR was used for diagnosis in clinically suspected cases of rickettsioses.

#### Instrument:

- ABI7500
- ABI StepOnePlus
- LightCycler 480 (Roche)
- LightCycler Nano (Roche)

#### Reagents:

- Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (TAKARA BIO)
- LightCycler 480 Probes Master (NIPPON Genetics)

# 学術誌に掲載された系について

- 測定機器(メーカー、機種)
- Master mix(メーカー、試薬種)
- トラブル
- その他の情報
  - ブロックのレファレンスセンター(感染研)へ情報を
  - 情報共有、課題、トラブルシューティングの共有

# 本日の予定

- イントロ（現状確認、発生状況 等）
- 診断マニュアルについて（方針）
- **情報発信について1**
- **情報発信について2**
- 意見交換

# 課題(活動)

- ~~マニュアル更新~~
- ~~検査系の評価~~
- 死亡例解析(症例解析) ～EBMの実践
  - 倫理申請
  - 協力要請
- 感染研HP(感染症の話)のupdate
  - 検査施設情報 ～アンケート調査による情報の更新

# リケッチア・レファレンスセンター

- 必要性

- 国内のリケッチア症(つつが虫病と日本紅斑熱)は、決して少なくない患者数が報告され、日本紅斑熱は増加している。
- 有効な抗菌薬がありながら、死亡例、重症化例もいまだ報告される。
- 地域によって発生時期が異なり、**地域状況に即した**症例対応が必要となる。
- 国内のリケッチア症の多様性ととも、様々な輸入症例が確認される。
- 報告に必須とされる実験室的診断技術の大部分がイン・ハウスの検査法である。
- リケッチア症は、患者発生地域に固有のベクターの消長に関する情報の把握や感染推定地域における感染源(ベクター、動物)の調査が重要であり、その調査技術の伝承・伝達や維持の課題。
- **関係機関が密に協議・連携し、情報共有、技術の標準化に必要な情報分析、相互支援。**

- 目的・役割

- 標準株、分離株の維持(リスク分散)。
- 診断用抗原並びにPCR陽性コントロールの分担作製と供給。
- 実験室診断技術の相互評価(技術の維持)
- 新規診断法等の相互評価。
- 疫学情報、診断情報の収集・分析と共有。
- 緊急時のバックアップ体制
- 検査マニュアルの作成、改訂
- 検査技術の研修
- その他

# 本日の予定

- イントロ（現状確認、発生状況 等）
- 診断マニュアルについて（方針）
- 情報発信について1
- 情報発信について2
- **意見交換**